

Universidad Complutense de Madrid
Master en Ciencias Odontológicas

¿El Nanocomposite arenado con Corindón Blanco tiene efecto sobre la adhesión y proliferación bacteriana?

Estudio *in vitro*



Giacomo Piacentini

Tutor: Dra. Bettina Alonso

2014

INDICE

1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	4
3. Objetivos e Hipótesis.....	14
4. Material y Métodos.....	16
4.1. Modelo Bacteriano y Cultivo.....	16
4.2. Materiales, Tipo y Cantidad de Discos Utilizados.....	17
4.3. Medición y ajuste de la concentración bacteriana.....	20
4.4. Formación del biofilm	22
4.5. Extracción del biofilm de los discos y recuento bacteriano.....	23
4.6. Análisis mediante Microscopía Láser Confocal.....	24
4.7. Análisis Estadístico.....	25
5. Resultados.....	26
6. Discusión.....	42
7. Conclusiones.....	47
8. Agradecimientos.....	48
9. Bibliografía.....	49

1.RESUMEN

Introducción: Los implantes dentales sustituyen a dientes ausentes en el paciente totalmente o parcialmente edéntulo. Las características físico-químicas de las superficies pueden tener influencia sobre la formación de biofilm y la manifestación de patologías peri-implantarias, pero también se ha demostrado que pueden favorecer la re-osteointegración en su tratamiento.

El objetivo del presente trabajo es comprobar si la superficie de un disco de material compuesto cerámico-cerámico Nanocomposite Z10Ce con un recubrimiento (arenado ("sandblasting")) con corindón blanco (material A) afecta *in vitro* a la formación y a la maduración de un biofilm de seis bacterias seleccionadas previamente.

Material y métodos: Las seis bacterias seleccionadas, (*Streptococcus oralis*, *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromona gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) se depositaron en la superficie de los discos de este material A y en discos de hidroxiapatita (HA) usados como control,. Tres discos de cada material se colocaron en una placa de cultivo celular, y se cubrieron con 1.5 ml de inóculo formado por las seis bacterias. Las placas se incubaron en condiciones de anaerobiosos durante 24, 48 y 72 horas, a 37º C. El análisis de viabilidad bacteriana en el biofilm se realizó mediante Microscopía Confocal (CLSM). Los recuentos bacterianos se realizaron mediante microscopía óptica. Para comparar el nº de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL obtenido de cada bacteria en ambos discos en cada tiempo de estudio se realizó mediante test estadístico de comparación de medias. Para el estudio de la evolución en el tiempo de cada especie en ambos discos se realizó el análisis de la variancia (ANOVA).

Resultados: En el presente trabajo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas superficies en la concentración de las especies bacterianas utilizadas. En cada tiempo de estudio la concentración celular sobre ambos discos parece ser muy similar. (Solamente *S. oralis* se presenta en menor cantidad en el disco del material A, comparando su concentración entre 48-72 horas y 24-72 horas). En las imágenes del microscopio confocal (CLSM) se observa una menor presencia bacteriana a las 24 y 48 horas de evolución, y a las 72 horas una mayor presencias de células que retienen coloración roja, índice de pérdida de vitalidad.

Conclusiones: El presente trabajo demuestra que el disco del material A arenado con corindón blanco no es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano respecto a la Hidroxiapatita. Puede tener algún efecto sobre el número total de microorganismos presentes, pero no se encontró significación estadística. Son resultados preliminares, y se necesita aumentar el número de experimentos para confirmar estos resultados.

2.INTRODUCCIÓN

El uso de implantes dentales es una práctica muy difundida al día de hoy en la odontología mundial. Los implantes sirven para sustituir a dientes ausentes en pacientes parcialmente o totalmente edéntulos.

Estos dispositivos han ampliado mucho las opciones de tratamiento en sujetos que presentan pérdidas dentales. Hay estudios que señalan cómo después de 5-10 años, más del 90% de los implantes colocados siguen funcionando (Berglundh et al., 2002).

A pesar de eso, los implantes no están libres de complicaciones. Estas pueden ser de naturaleza mecánica, como la falta de osteointegración o la pérdida de la misma por fuerzas excesivas que actúan sobre la reconstrucción protésica, o por causas biológicas, representadas por un grupo de alteraciones denominadas patologías peri-implantarias que comprenden la mucositis y la peri-implantitis (Alberktsson e Isidor, 1994).

La primera se define como una lesión reversible caracterizada por la inflamación de la mucosa que rodea a un implante osteointegrado, sin pérdida del hueso de soporte, mientras que la peri-implantitis es caracterizada también por la pérdida ósea y es irreversible.

Los datos provenientes del Sexto Taller Europeo de Periodoncia (Lindhe y Meyle, 2008) y de una revisión sistemática de Zitzmann y Berglundh (2008), indican que la prevalencia de estas infecciones es similar a las de las enfermedades periodontales, presentando mucositis peri-implantaria en el 80% de los pacientes portadores de implantes dentales y al 50% de dichos implantes y peri-implantitis entre el 28 y el 56% de los sujetos y entre el 12% y el 43% de los implantes.

Las enfermedades periodontales tienen naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa (Loe, 1965; Lindhe et al., 1975). Se postula que las enfermedades peri-implantarias también estén causadas por bacterias presentes en los biofilms orales, tanto sobre las superficies de los implantes como en los tejidos blandos peri-implantarios (Lang y Berglundh 2011).

Los dientes y los implantes ofrecen una superficie sólida sobre la cual los microorganismos son capaces de adherirse y de organizarse en forma de biofilm (Marsh 2005). Los biofilms son estructuras tridimensionales y se componen por diferentes comunidades bacterianas, que están rodeadas por un glicocálix, formado por exopolisacáridos (Costerton 1999). Estos son el componente principal de las biopelículas y constituyen entre el 75 y el 80% de su volumen, mientras que las células bacterianas ocupan entre el 20 y el 25%. Son muy útiles porque representan una fuente de nutrientes para las bacterias, que son a la vez sus principales productores gracias a su actividad metabólica. Además los exopolisacáridos, permiten mantener la integridad y la estructura del biofilm (Marsh 2005).

Dentro de las biopelículas conviven al mismo tiempo diferentes especies de bacterias. Esta característica se denomina “heterogeneidad fisiológica”. Las comunidades pueden vivir en condiciones ambientales (determinadas por pH, temperatura, potencial REDOX y concentración de nutrientes) muy diferentes, aún estando muy próximas unas a otras y generalmente son separadas por pequeños espacios denominados canalículos, por los que pasan nutrientes y metabolitos. Las condiciones ambientales van cambiando desde la superficie a las zonas más profundas, y de acuerdo con ellas, se modifican también los microorganismos presentes. Las biopelículas se caracterizan por un gradiente negativo de nutrientes y de potencial REDOX según se va profundizando, así que las zonas mas superficiales están ocupadas principalmente por bacterias aerobias o anaerobias facultativas, y las áreas más profundas por bacterias anaerobias. El biofilm ofrece ulteriores ventajas a las bacterias que lo componen comparadas con las mismas especies en estado planctónico (Marsh 2005).

Las distintas comunidades tienen la capacidad de comunicar entre sí por un fenómeno denominado *Quorum Sensing*. Gracias a esto las bacterias pueden tener la percepción de su número y regular su expresión genética. Esto acontece gracias a la acumulación de moléculas de señalación que median la comunicación intercelular. Al mismo tiempo pueden transmitir

material genético de una célula a otra, difundiendo por ejemplo genes responsables del desarrollo de resistencias a los antibióticos (Costerton 2001). Se ha calculado que las bacterias organizadas en biofilm presentan hasta 1000 veces más resistencia a los antibióticos respecto a las células en estado planctónico.

La estructura de la biopelícula y la presencia de exopolisacáridos proporciona una constante fuente de nutrientes para las bacterias que la ocupan y constituye una importante defensa frente a mecanismos inmunitarios del huésped como la fagocitosis. Al mismo tiempo, las moléculas producidas por una célula pueden servir como fuente energética para otras especies. A pesar de eso, las relaciones entre las distintas especies bacterianas dentro de una biopelícula no siempre son sinérgicas, ya que a veces pueden desarrollarse interacciones de antagonismo (Socransky, Haffajee 2001).

El biofilm se forma gracias a la adhesión y a la co-agregación entre microorganismos sobre una superficie. Sus mecanismos de formación no son casuales. Parece que determinadas especies tengan tendencia a co-agregarse entre sí de forma específica. Además la secuencia de incorporación de distintas especies bacterianas parece tener un patrón constante.

Las fases de crecimiento y maduración de la placa bacteriana bajo forma de biopelícula han sido estudiadas por microscopía óptica y electrónica por Theilade y Theilade (1985).

La primera fase de formación se caracteriza por la adsorción de glicoproteínas (mucinas) y moléculas hidrofóbicas salivales, que forman la película adquirida, sustancia fundamental para el posterior desarrollo del biofilm. Posteriormente, microorganismos aislados se unen a la película adquirida. Estas bacterias presentan estructuras específicas de naturaleza proteica que les permiten adherirse al sustrato. Forman parte de este grupo los *Streptococos*, Gram + anaerobios facultativos. Mientras que se van multiplicando, nuevas especies, principalmente *Actinomyces*, pueden adherirse directamente a la superficie dental o co-agregarse a las células ya presentes y se van incorporando también las especies denominadas “puente”. La bacteria

más representativa de este grupo es *F. nucleatum*. Estas células proporcionan las estructuras para que los últimos colonizadores (anaerobios Gram -) puedan incorporarse a la biopelícula. La unión a una superficie y entre distintas especies tiene naturaleza específica (figura 1). Esto ha sido estudiado por el grupo de Socransky (1998). Estos autores analizaron más de 13000 muestras bacterianas en 185 adultos y desarrollaron un modelo de asociación estadística específico entre las bacterias que participan en la formación del biofilm oral. Según esta asociación y secuencia de aparición distribuyeron las bacterias en clústers. De esta forma los colonizadores primarios se dividen en cluster azul, amarillo, verde y violeta. Los dos últimos complejos se componen por especies que se consideran como los mayores agentes etiológicos de la periodontitis. La disposición en el esquema no es casual, ya que los dos últimos clústers (Naranja y rojo) estarían dirigidos hacia el epitelio de la bolsa periodontal, mientras que los colonizadores primarios formarían la fase adherida a la superficie radicular, según el modelo de Listgarden (1976).

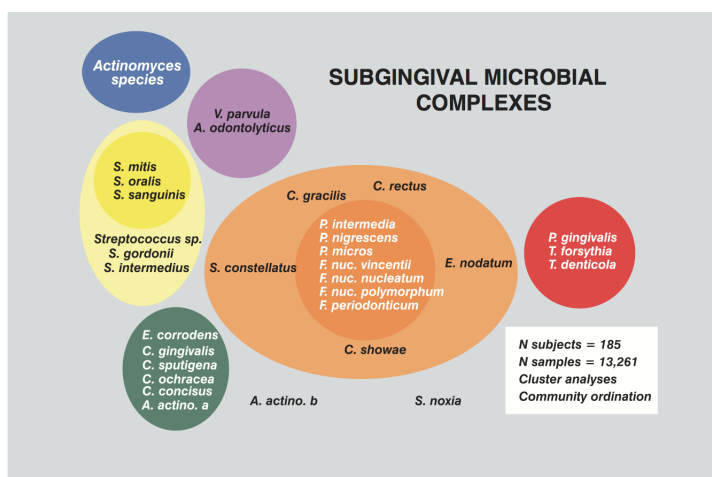


Figura 1. Esquema de la asociación entre especies subgingivales tomado de Socransky et al. 1998. Los datos provienen de 13.261 muestras de placa subgingival tomadas de 185 adultos. Los complejos de la izquierda están compuestos por especies que se cree que colonizan la superficie dentaria y proliferan en estadios tempranos. El complejo naranja se cree que es el puente entre los colonizadores iniciales y las especies del complejo rojo que dominan en etapas tardías. (Socransky et al. 1998).

Las interacciones bacterianas fueron estudiadas también según las uniones específicas adhesina-receptor (Kolebrander 2002). Este estudio (figura 2) confirma los resultados del modelo de Socransky (1998).

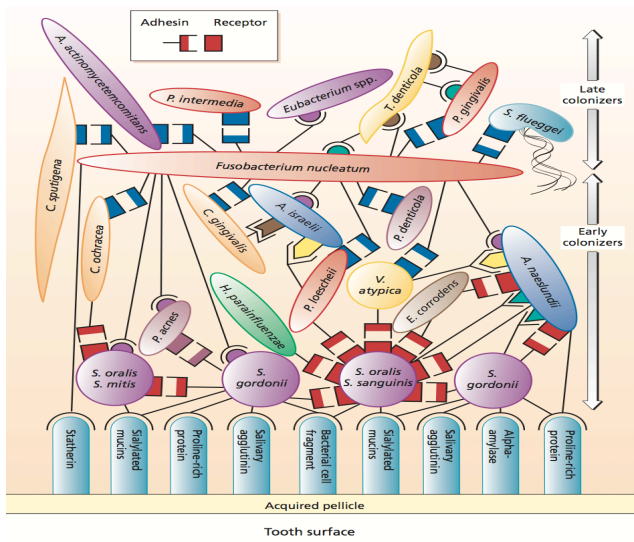


Figura 2. Imagen que representa el esquema propuesto por Kolebrander (2002). El biofilm se forma en diferentes etapas, y la agregación entre los distintos colonizadores es determinada por la interacción específica adhesina-receptor. En la porción inferior están las glicoproteínas principales que forman la película adquirida. Sobre ellas están los colonizadores primarios, los secundarios, las especies puente y por últimos los tardíos. Las asociaciones encontradas por Kolebrander coinciden con las de Socransky (1998).

Se ha hipotetizado que la formación del biofilm sobre superficies dentales o implantarias ocurre según un patrón similar. En un estudio se comparó el desarrollo de la biopelícula sobre dientes e implantes durante un período de tres semanas (Pontoriero 1994). Basándose en el modelo de Berglundh y Lindhe (1992), se indujeron una gingivitis y una peri-implantitis experimental y las muestras se analizaron mediante microscopio de contraste de fases. Las muestras revelaron proporciones similares de Cocos Gram +, bastoncillos y espiroquetas tanto en dientes como en implantes, al tiempo basal y a las tres semanas. Los resultados, además, eran parecidos a los propuestos por el modelo de gingivitis experimental de Loe (1965). Con el tiempo, estudios posteriores apuntaron la posibilidad de que un número limitado de casos pueda albergar una microbiota diferente, más parecida a la de otras infecciones asociadas con sistemas médicos implantados.

Aunque no hay evidencia de la existencia de un número limitado de patógenos específicos para la peri-implantitis, algunos estudios han indicado que las infecciones peri-implantarias en ocasiones pueden estar relacionadas con una microflora con un perfil diferente al de la enfermedad periodontal (Mombelli y Décaillot 2011).

El material más utilizado en la fabricación de implantes dentales es el Titanio (Ti), y puede ser tratado de distintas formas (Bauer et al. 2013).

La rugosidad, composición química o hidrofobicidad de las superficies, que en los últimos años han evolucionado enormemente, han demostrado que pueden tener influencia sobre el comportamiento del implante, por un lado aumentando la osteointegración (Taborelli 1997) y por otro favoreciendo la colonización de bacterias procedentes del biofilm subgingival (Wennerberg y Albrektsson 2010).

El tratamiento de las superficies implantares provoca alteraciones tanto en las características químicas superficiales, como en la cantidad de superficie en contacto con el tejido óseo. Se produce un cambio en la rugosidad superficial y esto podría facilitar la unión entre implante y hueso (Junker 2009).

Hay diferentes formas de tratar las superficies implantares. El spray de partículas de Ti al plasma, dispara las partículas sobre la superficie del dispositivo, aumentando la rugosidad superficial. Esto aumenta la fuerza de tensión en el interfase hueso-implante, favoreciendo la osteointegración (Le Guéhennec 2007).

Las partículas cerámicas han sido ampliamente estudiadas. Los materiales más utilizados son la Alúmina (Al), el óxido de Titanio (TiO₂) y el fosfato de Calcio (CaP), que se puede presentar como Hidroxiapatita (HA), beta-fosfato-tricálcico o como una mezcla entre estos componentes. Su mecanismo de acción se produce mediante la formación de una capa de apatita en la interfase entre el tejido óseo y el implante, que sirve como estructura de sostén para las células osteoformadoras y contiene proteínas endógenas que tienen propiedades osteoinductoras. Se han encontrado mejores resultados clínicos a largo plazo, debido a la mayor osteointegración inicial (Le Guéhennec 2007).

El uso de agentes ácidos, como el ácido clorhídrico (HCl) u otros (H₂SO₄, HNO₃) crea microporosidades superficiales que aumentan la superficie de contacto hueso-implante.

El tratamiento superficial se puede llevar al cabo sumergiendo los dispositivos implantares en soluciones que contienen un único agente ácido o combinaciones de ellos. Está muy difundido el uso de dos agentes. Esto crea poros superficiales que favorecen la osteoconducción y la adhesión de la malla de fibrina que atrapa las plaquetas (Le Guéhennec 2007 y Tabborelli 1997), las cuales secretan factores de crecimiento que inducen la diferenciación de las células osteo-progenitoras a células formadoras de hueso. El tratamiento con partículas y con agentes químicos se puede combinar, mediante el pulido con chorro de arena y el posterior tratamiento con ácido (SLA). De esta forma se puede incrementar el área de la interfase hueso-implante, favoreciendo la osteointegración (Taborelli 1997).

Estudios recientes indican que diferentes superficies implantarias podrían tener influencia sobre la manifestación y la progresión de las enfermedades peri-implantarias (Albouy et al. 2008). Las superficies tratadas, presentando irregularidades como poros o rugosidades, pueden favorecer la retención de placa, y de esta manera facilitar la evolución de estas lesiones.

Albouy y Berglundh (2008) han estudiado la progresión natural de la peri-implantitis, obtenida por el modelo experimental propuesto por Lindhe (1992), comparando cuatro diferentes superficies implantares (Pulida, TiO₂, SLA, Ti-Unite). Los autores concluyen que las superficies rugosas favorecen la progresión espontánea de las lesiones peri-implantarias.

En una revisión sistemática reciente, Renvert (2011) afirma que existe sólo una limitada evidencia sobre el efecto que tienen las superficies rugosas en la progresión de las patologías peri-implantarias, y que hacen falta más estudios en este campo. Según las conclusiones de este estudio, en los pacientes con historia previa de periodontitis puede ser útil la aplicación de dispositivos implantares híbridos. Así, ante la instauración de una lesión peri-implantaria, los microorganismos se encuentran ante una superficie lisa, que dificulta la progresión de la patología. Al mismo tiempo, en la porción más apical del implante, está una superficie rugosa

que favorece la osteointegración.

Persson (1999) estudia la re-osteointegración tras el tratamiento de lesiones peri-implantarias inducidas según el modelo experimental (Lindhe 1992). Los datos obtenidos por este estudio indican que el infiltrado inflamatorio está ausente al finalizar el tratamiento, y que los defectos óseos estaban completamente rellenados, pero la re-osteointegración sobre la superficie implantaria descontaminada se producía únicamente en la porción más apical del defecto, y que en la mayoría de las localizaciones una capa de tejido conectivo separaba el tejido óseo neo-formado de la superficie del implante. En un estudio posterior a boca partida (Persson 2001) se ha estudiado la re-osteointegración en implantes con superficie lisa y pulida frente a dispositivos con superficie tratada (SLA). Los resultados de las biopsias tras el tratamiento de los defectos originados por la patología peri-implantaria indicaban que el porcentaje de re-osteointegración variaba mucho entre los sistemas implantares. Las superficies lisas presentaban un 22% de superficie re-osteointegrada frente a un 84% de las tratadas (SLA).

Renvert (2011) atribuye esta diferencia a la mayor capacidad que presentan las superficies rugosas de estabilizar el coágulo sanguíneo y favorecer así una mejor formación y el contacto del tejido óseo con el implante.

Para estudiar más detalladamente las interacciones bacterianas que ocurren sobre diferentes superficies, en los últimos años se han desarrollado diferentes modelos de formación de biofilm *in vitro*. Uno de los modelos de referencia fue elaborado por Sánchez et al. (2011). En éste, se utilizaron seis bacterias dentro de las cuales estaban colonizadores iniciales (*S. oralis* y *A. naeslundii*), tempranos (*V. parvula*), secundarios (*F. nucleatum*) y tardíos (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*) y se pusieron en contacto con discos de hidroxiapatita estériles durante diferentes tiempos de incubación (1, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 o 168 horas). Los biofilms formados se analizaron mediante técnicas de microscopía láser confocal y se

encontró que el patrón de colonización y maduración del biofilm era muy similar al comportamiento de la biopelícula subgingival.

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es observar y estudiar el comportamiento de discos de material compuesto cerámico-cerámico de Nano Composite Z10Ce, con un recubrimiento (arenado (“sandblasting”)) llevado a cabo durante 60 segundos con partículas de corindón blanco con un tamiz < 90 micras, y de un diámetro de 7 milímetros y un espesor de 2 milímetros, tomando como referencia discos de Hidroxiapatita (Clarkson Chromatography Products; Williamsport, PA, USA) de diámetro de 7 milímetros y espesor de 1,8 milímetros; en respuesta a la formación de biofilm que se forma/organiza mediante el modelo *in vitro* puesto a punto en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, (Sánchez et al. 2011).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Análisis del comportamiento de los discos de Nanocomposite Z10Ce arenados con partículas de corindón blanco de tamaño < 90 micras expuesto al modelo de biofilm formado por las 6 especies bacterianas previamente seleccionadas, durante diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) de incubación, según el modelo elaborado por Sánchez et al. (2011).
- Estudiar la viabilidad de los microorganismos en el material en comparación con la hidroxiapatita mediante Microscopia Láser Confocal.
- Identificar y cuantificar el número de UFC/mL de cada una de las especies bacterianas que forman parte del biofilm generado en el material de estudio con respecto a la hidroxiapatita.

HIPÓTESIS:

El material compuesto cerámico-cerámico Nanocomposite Z10Ce arenado con partículas de corindón blanco de tamaño < 90 micras afecta a la adhesión, formación y maduración de un modelo de biofilm *in vitro* a las 24, 48 y 72 horas de incubación

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 CEPAS SELECCIONADAS Y MEDIOS DE CULTIVO

La formación de un biofilm con bacterias orales sobre distintas superficies de implantes se ha realizado seleccionando bacterias que representan a los colonizadores primarios, secundarios y tardíos: *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*. Las cepas utilizadas y las colecciones de cultivo tipo a la que pertenecen se muestran en la Tabla 1. Las cepas se mantienen crio- conservadas a -80°C.

Tabla 1.- Cepas seleccionadas en el estudio y colección de cultivo tipo

Cepa	Referencia
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	DSMZ ¹ 20482
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	DSMZ 8324
<i>Veillonella parvula</i>	NCTC ² 11810
<i>Actinomyces naeslundii</i>	ATCC ³ 19039
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277
<i>Streptococcus oralis</i>	CECT ⁴ 907T

¹DMS, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und ZellKulturen

²NCTC, National Collection of Type Cultures

³ATCC, American Type Cultures Collection

⁴CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

Las bacterias se cultivaron en medio sólido en placas de medio Agar Sangre y de medio Dentaïd-1. El Agar Sangre (Oxoid no 2; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) se pone a esterilizar en autoclave a 121° C, luego se atempera a 45° C a baño maría y posteriormente se suplementa con un 5% de sangre de caballo, Hemina (5 mg/L) y Menadiona (1 mg/L). El medio Dentaïd-1 (Fumarato Sódico 1,5 g, formato sódico 1g, extracto de levadura 5 g, BHI agar, 52 g), también se pone a esterilizar en autoclave a 121° C y luego se tempera a 45° C a baño maría y posteriormente se añade vancomicina (1,8 ml) esterilizada por filtración.

También se cultivaron en medio líquido en medio de cultivo BHI modificado. Este medio consiste en medio BHI (Brain Heart Infusion, Becton, Dickinson and Company; EE.UU.) suplementado con: mucina (2,5 g/L), extracto de levadura (1,0 g/L), cisteína (0,1 g/L), bicarbonato sódico (2,0 g/L), hemina (5 mg/L), menadiona (1 mg/L), 0,25% de ácido glutámico (v/v).

4.2 MATERIALES UTILIZADOS

Los materiales que se utilizaron en el desarrollo del estudio (figura 3), con forma de discos de 7 mm de diámetro y 1,8 mm de espesor fueron:

1. Disco Control : Hidroxiapatita (Clarkson Chromatography Products)
2. Disco experimental: material compuesto cerámico-cerámico Nanocomposite Z10Ce con recubrimiento (arenado (“sandblasting”) con corindón blanco con un tamiz < 90 micras durante 60s (material A) (elaborado en el Centro de Investigación en Nanomateriales y Nanotecnología (CINN)–Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)–Universidad de Oviedo (UNIOVI)).

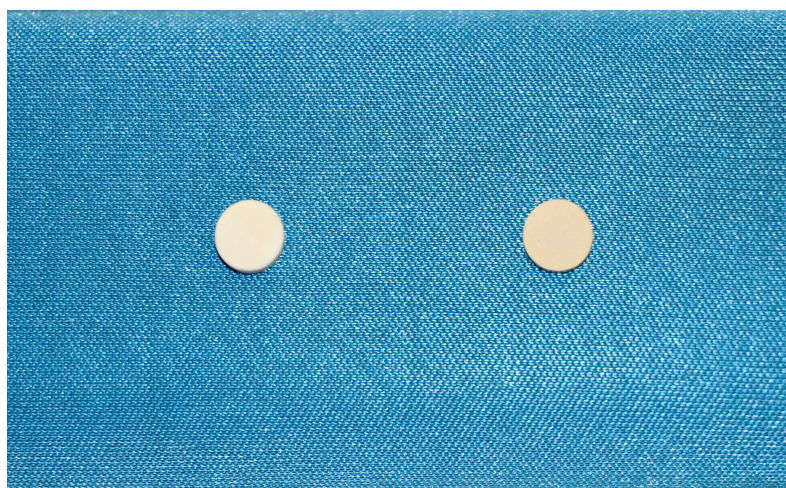


Figura 3. En la izquierda el disco de hidroxiapatita (HA), y a la derecha el de material A cubierto por corindón blanco.

4.3 MEDICIÓN Y AJUSTE DE CONCENTRACIÓN BACTERIANA

Las bacterias seleccionadas se obtuvieron de criobolas conservadas a una temperatura de -80°C . Las criobolas se sembraron en placas de medio Agar Sangre suplementado y se incubaron en condiciones de anaerobiosis a una temperatura de 37°C durante el tiempo necesario para que se produzca la formación de colonias. Posteriormente se renovó el crecimiento bacteriano, tomando una colonia formada, mediante un asa estéril en forma de “loop”, y sembrándola en una nueva placa de Agar Sangre suplementado. Una vez que se formaron las colonias en la nueva placa de Agar Sangre suplementado, se cultivaron las bacterias en un medio de cultivo líquido BHI modificado (preinóculos). Para ello, se recogió una colonia de cada una de las especies, y se introdujeron en distintos tubos Falcon de 50 mL (figura 4) que contenían 10 mL de BHI modificado. De esta forma, tendríamos seis tubos, cada uno con un tipo de bacteria, y un tubo que contiene sólo BHI modificado como control negativo.

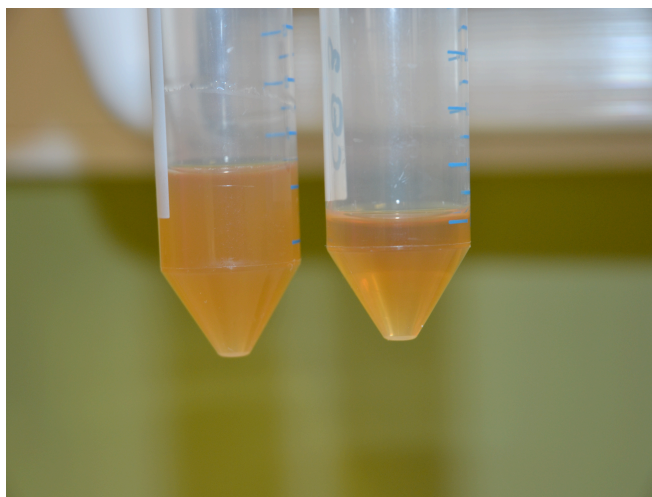


Figura 4. Imagen de dos tubos Falcon de 50 mL. En la izquierda el Control de BHI modificado estéril, y en la derecha el de test, que contiene bacterias en suspensión. Se puede apreciarla diferencia en la turbidez de los dos medios.

Se incubaron en condiciones de anaerobiosis a una temperatura de 37°C , hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento en cada uno de ellos, la cual se comprueba mediante la medida espectrofotométrica a 550 nm.



Figura 5. Imagen de un espectrofotómetro. Este aparato permite determinar la concentración de bacterias en términos de Unidades de Densidad óptica (O.D.).

Con el fin de inocular una concentración constante de cada una de las cepas en todos los ensayos, favoreciendo así la reproducibilidad del modelo, se emplearon las curvas de crecimiento de cada bacteria, desarrolladas por Sánchez et al. en 2011, para el modelo de biofilm estático. Estas curvas permitieron relacionar los datos de densidad óptica (D.O), obtenidos mediante medición en espectrofotómetro (Figura 5), con el estado de crecimiento bacteriano y las unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (UFC/mL).

Tabla 2. Concentración final (ufc/mL) en el preinóculo utilizada en todos los ensayos

Cepa	Concentración final (ufc/mL)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	10^6
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	10^6
<i>Veillonella párvula</i>	10^5
<i>Actinomyces naeslundii</i>	10^5
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10^6
<i>Streptococcus oralis</i>	10^3

4.4 FORMACIÓN DEL BIOFILM SOBRE LAS SUPERFICIES DE ESTUDIO

Se preparó un tubo Falcon de 50 mL con un inóculo de 10 mL que contiene las 6 especies bacterianas seleccionadas (6 mL de las especies bacterianas y 4 mL de medio BHI modificado), al valor de UFC/mL anteriormente descrito en la tabla 2, y que se mantenía constante en todos los ensayos a fin de favorecer la reproducibilidad del modelo. Se ajustó la densidad óptica por dilución en el medio BHI modificado fresco hasta los valores estipulados en el estudio. Estos valores vienen determinados por el tiempo de generación de cada bacteria, corroborado en las curvas de crecimiento. Se agitó y se añadieron 1.5 mL de este inóculo a una placa de cultivo celular de 24 pocillos estéril (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania) en la que previamente, se han depositado los discos correspondientes a cada material con una pinza estéril (figura 6), y se ha añadido medio BHI modificado sin bacterias como control negativo. Al finalizar el proceso, la placa se incubó en condiciones de anaerobiosis a una temperatura de 37° C durante el periodo de estudio que variará entre 24, 48 y 72 horas.



Figura 6. En la imagen, la placa de cultivo celular de 24 pocillos en la cual se depositan los discos de hidroxiapatita y del material A

4.5 EXTRACCION DEL BIOFILM DE LOS DISCOS Y RECUENTO BACTERIANO

Pasados los distintos tiempos de incubación del biofilm (24, 48 y 72 h), los discos se sacaron de la placa de cultivo en condiciones de esterilidad, se introdujeron en un tubo Eppendorf que contenía 1 mL de buffer PBS estéril (*Phosphate Buffered Saline*) y se agitó durante 2 min con el fin de separar el biofilm de la superficie del disco y disgregarlo para separar las diferentes especies bacterianas que lo componen. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 100 µL, que se diluyeron de forma seriada en buffer PBS estéril (*Phosphate Buffered Saline*) y se sembraron en placas de Agar Sangre suplementado y de Dentaïd-1, siempre por duplicado, por el método de siembra en superficie. Las placas inoculadas se incubaron en anaerobiosis a 37°C. Después de 7-10 días de incubación, se realizaron los recuentos de las UFC por placa de cada especie bacteriana, para determinar el número total de UFC/mL.

4.6 MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL (CLSM)

Se procedió a la obtención de mapas topográficos del crecimiento y maduración del biofilm sobre la superficie del material en estudio y de la hidroxiapatita. Se estudiaron las diferentes etapas en el desarrollo del biofilm a las 24, 48 y 72 horas de incubación mediante la técnica de Microscopía Confocal, CLSM (por sus siglas en inglés Confocal Laser Scanning Microscopy). Este análisis se llevó a cabo en el Centro de Asistencia a la Investigación - Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

En cada tiempo de incubación se analizó un disco para el material A y otro para la hidroxiapatita. El análisis del biofilm por CLSM ha permitido obtener una proyección tridimensional del mismo. Al utilizar los fluorocromos que se citan continuación, se puede analizar y semi-cuantificar el número de bacterias vivas y muertas. El biofilm se tiñó con el Kit *LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit* (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.), que proporciona una combinación de dos fluorocromos, el "SYTO 9 green-fluorescent nucleic acid stain" y el "Ioduro de Propidio red-fluorescent nucleic acid stain", que se diferencian en sus

características espectrales y en su capacidad de penetración en las células bacterianas. El fluorocromo SYTO 9 es capaz de penetrar en todas las bacterias presentes en una muestra, tanto con las membranas celulares intactas como dañadas. En contraste, el Ioduro de Propidio penetra únicamente en bacterias con membranas dañadas, causando una reducción de la fluorescencia del SYTO 9 cuando los dos fluorocromos están presentes en la misma célula. Por tanto, la combinación adecuada de ambos fluorocromos, permite marcar las células bacterianas de una muestra, de forma que las bacterias con sus membranas celulares intactas presentarán fluorescencia verde, mientras que las bacterias con la membrana dañada emitirán fluorescencia roja. La máxima excitación/emisión para estos fluorocromos es de aproximadamente 480/500 nm para SYTO 9 y 490/635 nm para Ioduro de Propidio.

Para obtener la señal óptima de fluorescencia se ha puesto a punto la técnica previamente, utilizando diferentes ratios de concentración de los fluorocromos y diferentes tiempos de tinción. Se ha seleccionado el ratio 1:1 y el tiempo de tinción de 9 ± 1 min.

La observación del biofilm por esta técnica ha permitido, en primer lugar, y al observarlo con el objetivo de 10X, obtener una visión general del biofilm desarrollado y de su estructura. Además permite conocer su espesor o altura.

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron dos análisis estadísticos. Por un lado una comparación de medias y por otro lado un análisis de la varianza (ANOVA). En ambos análisis, se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov para cada variable y los datos se expresaron como medias y desviaciones estándar (DE), además se han utilizado Box-plots para la presentación gráfica de los datos.

El análisis de comparación de medias se utilizó para la comparación de las concentraciones bacterianas de cada microorganismo sobre ambas superficies (HA y material A) para cada tiempo de incubación (24, 48 y 72 horas). Se utilizaron tres discos de cada material (n=3).

El método estadístico adoptado fue el de comparación de medias en cada tiempo y para cada especie. De esta manera fue posible primero establecer una media entre los tres discos de cada material para cada bacteria en cada uno de los tiempos de estudio y hacer la comparación estadística.

Para analizar el comportamiento de cada especie en ambas superficie durante el tiempo, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA).

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a $p < 0,05$.

El programa estadístico empleado fue STATGRAPHICS Plus para Windows 5.1 (Statistical Graphics Corp. E.E.U.U.).

5. RESULTADOS

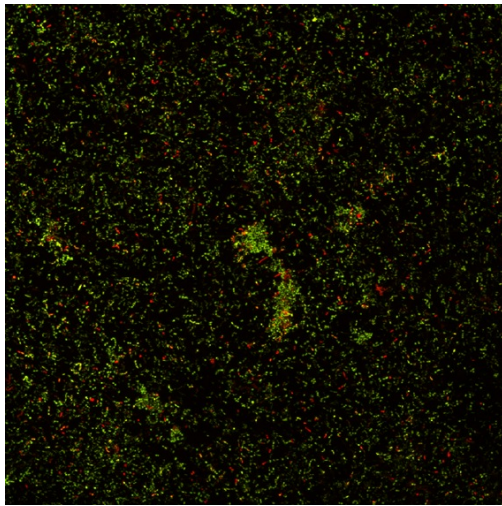
Descripción imágenes CLSM

La formación del biofilm se analizó mediante Microscopía Láser Confocal (CLSM) en cada uno de los discos y a los diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas). El biofilm presenta una estructura tridimensional que deriva de la acumulación de células y de la secreción de exopolisacáridos (EPS) que forman la matriz. Mediante CLSM fue posible analizar tanto el espesor de la biopelícula, como la viabilidad de las bacterias, al ser marcadas éstas con dos fluorocromos (“SYTO 9 green-fluorescent acid stain” e “ioduro de propidio red fluorescent nucleic acid stain”).

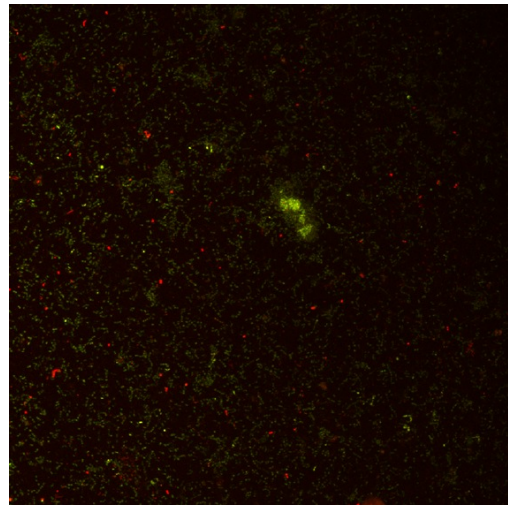
A las 24 horas en el disco de hidroxiapatita (HA) se observó que la mayoría de las bacterias se disponen en pequeñas colonias o como células aisladas. En el centro de la imagen se podría apreciar la formación de estructuras bacterianas más complejas, que se denominan torres.

Aunque hubiese presencia de colonias muertas, la gran mayoría de ellas presenta vitalidad.

En el disco del material A, en cambio, presentaba una menor cantidad de bacterias y se encontraban más dispersas. Se notaba la formación de una única torre de bacterias viables en el centro de la imagen, mientras que las demás células estaban aisladas o formando pequeñas colonias y con un número mayor de células muertas (figura 7).



HA

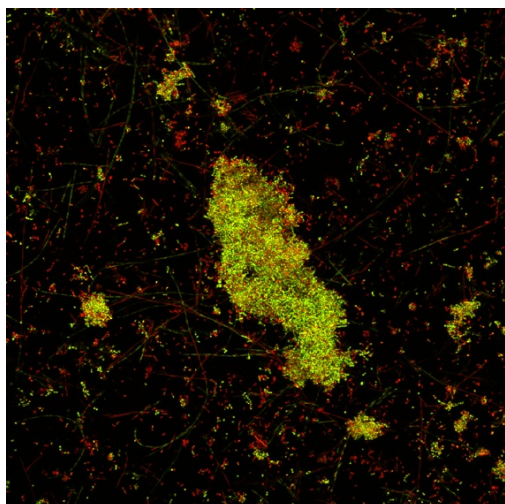


MATERIAL A

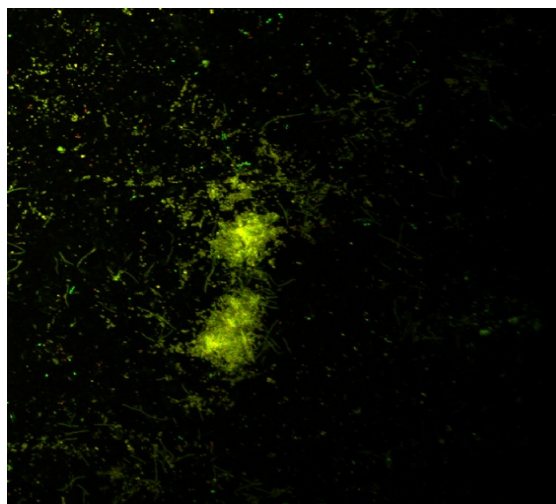
Figura 7 Imágen de microscopio confocal (CLSM) que representa el biofilm a las 24 horas. En la izquierda el disco de hidroxapatita (HA), En la derecha el disco del material A.

A las 48 horas, en el disco de HA, se observó que las bacterias se agrupaban en una torre central que presentaba forma alargada, y en pequeñas colonias dispersas. Mientras que en la agrupación central prevalecían las bacterias vivas, en las colonias pequeñas y dispersas los microorganismos parecía que estaban más muertos.

En cambio, en el disco del material A, se podían apreciar dos torres en el centro de la imagen, más pequeñas que en el disco de HA, y pocas colonias aisladas. Comparándolo con la HA, en el disco de material A parecía haber una menor cantidad de células. Las bacterias estaban viables, y casi no se encontraban células muertas. La cantidad de bacterias en el disco de material A parecía ser menor que en el de HA (Figura 8)



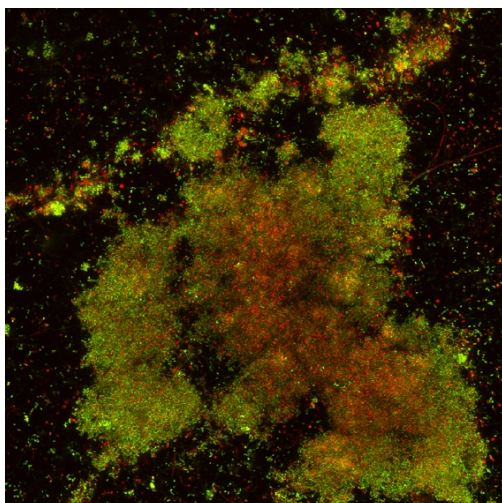
HA



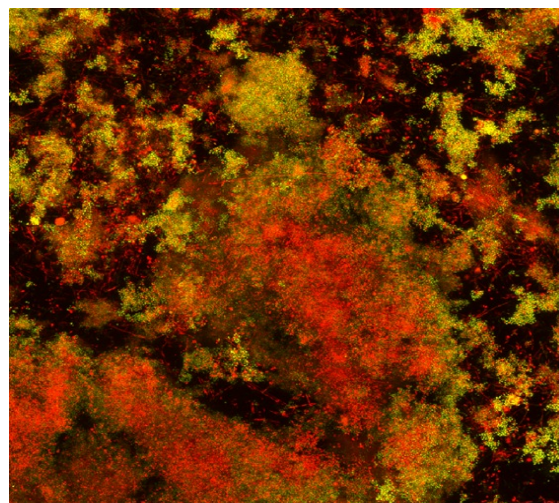
MATERIAL A

Figura 8. Biofilm a las 48 horas. A la izquierda el disco de HA. En la derecha el disco del material A.

A las 72 horas, en el disco de HA, se podrían apreciar muchas células que se disponían en una torre central de mayor tamaño y en la parte superior de la imagen había otras torres más pequeñas que parecían estar dispuestas en línea. En los sectores más periféricos se distinguían varias colonias pequeñas. En el centro de la torre principal se podía notar mayor presencia de bacterias muertas, mientras que hacia los bordes las células parecían ser más viables. En las torres más pequeñas también se apreciaba un número mayor de bacterias vivas. El disco del material A, a las 72 horas, estaba casi totalmente cubierto por el biofilm, y la mayoría de las células estaban muertas; en comparación con la HA cuyas células estaban más vivas (Figura 9).



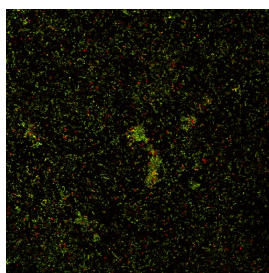
HA



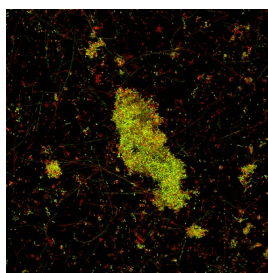
MATERIAL A

Figura 9. Biofilm a las 72 horas. A la izquierda el disco de HA. En la derecha el disco del material A.

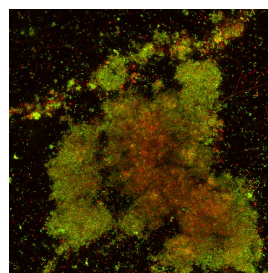
Las biopelículas se desarrollaron en tiempos diferentes. En el disco de HA a las 24 horas de evolución las bacterias parecían estar más dispersas. La mayoría de ellas se organizaban en pequeñas colonias aisladas. Observando la imagen correspondiente a 48 horas de maduración se notaba como las células se iban organizando en torres de mayor tamaño. La mayor parte de ellas parecían ser viables, pero comenzaban a aparecer colonias aisladas que presentaban coloración roja, índice de posible pérdida de viabilidad. El número total de bacterias aumentaba considerablemente a las 72 horas, aunque también aumentaba la mortalidad bacteriana (Figura 10). Con el paso del tiempo, se apreciaba un aumento de la población bacteriana sobre el disco de HA y la organización en torres que en principio (24 horas) eran más pequeñas, pero según va madurando el biofilm (48 y 72 horas), alcanzaban un tamaño mayor. Al mismo tiempo parecía aumentar el número de bacterias inviables a lo largo del tiempo de maduración del biofilm (Figura 10).



24 horas



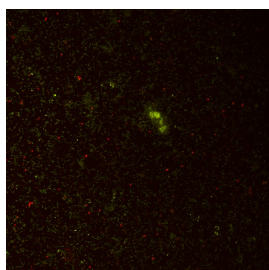
48 horas



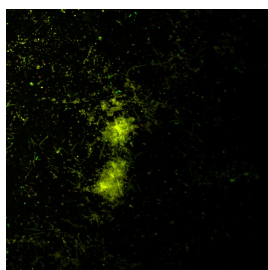
72 horas

Figura 10. Imágen de la maduración del biofilm sobre el disco de HA a las 24, 48 y 72 horas (de izquierda a la derecha).

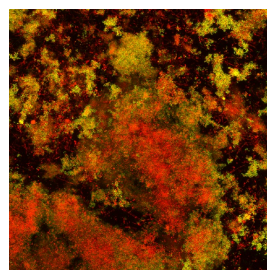
En el disco del material A, a las 24 horas de incubación del biofilm, no se observaba la presencia de torres o setas, solo se apreciaban bacterias dispersas, algunas vivas (la gran mayoría) y otras muertas. A las 48 horas, aumentaba el contenido celular sobre la superficie del disco, y se visualizaba la presencia de torres. Observando la imagen que representaba el biofilm de 72 horas y comparándola con las imágenes de 24 y 48 horas, se comprobaba como el biofilm cubría todo el campo de visión y se apreciaba un notable aumento de muerte celular (Figura 11).



24 horas



48 horas



72 horas

Figura 11 Imágen de la maduración del biofilm sobre el disco del material A a las 24, 48 y 72 horas (de izquierda a derecha).

Análisis cuantitativo de las bacterias mediante recuento por cultivo

Para identificar y cuantificar las especies bacterianas presentes en los biofilms desarrollados en la superficie de los discos,, se realizaron los recuentos bacterianos en las placas de medio Agar Sangre suplementado y de Dentaïd-1.

El análisis se realizó de esta forma:

- comparación del nº de UFC/mL de cada especie en el disco de HA y del material A para cada tiempo de incubación.
- evolución de cada especie bacteriana sobre la misma superficie a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas).

Comparación entre HA y Material A a las 24 horas.

A las 24 horas, en el disco del Material A, *P. gingivalis* (Pg) presentaba unos valores de UFC/mL superiores respecto a los encontrados en HA, pero que no eran estadísticamente significativos ($p= 0,94$).

V. parvula (Vp) parecía haber proliferado más en el disco de hidroxiapatita, comparado con el material de estudio, pero los resultados no eran estadísticamente significativos ($p= 0,97$).

A. naeslundii (An) no estaba presente a este tiempo de incubación en ninguno de los materiales objeto de estudio (control y material A).

A este tiempo de incubación, *F.nucleatum* (Fn) se presentaba en menor cantidad en el material A, comparado con la HA, pero el resultado no era estadísticamente significativo ($p= 0,08$).

A. actinomycetemcomitans se presentaba en mayor cantidad en la superficie del material A que en la HA, pero las diferencias no eran estadísticamente significativas ($p= 0,27$).

Comparación entre HA y Material A a las 48 horas.

A este tiempo parecía que Pg había proliferado más en el material de estudio, comparado con la HA, pero los resultados no eran estadísticamente significativos ($p=0,94$).

Otras especies, como Vp, parecían tener el mismo comportamiento, y los resultados no mostraban diferencias estadísticamente significativas ($p=0,59$).

An presentaba mayor nº de UFC/mL recuentos en la superficie del disco del Material A respecto a la HA, aunque los resultados no presentaban diferencias estadísticamente significativas ($p=0,75$).

Otras especies como Fn, en cambio, parecían haber proliferado más en el material de estudio respecto a la HA a este tiempo, pero las diferencias no eran estadísticamente significativas ($p=0,98$).

So también parecía proliferar más en el disco del Material A comparado con la HA, pero las diferencias no eran estadísticamente significativas ($p=0,91$).

Aa, en cambio, crecía más en la superficie de HA respecto a la del Material A, aunque los resultados no eran estadísticamente significativos ($p=0,94$).

Comparación entre HA y Material A, 72 horas.

A este tiempo, Pg parecía encontrarse a mayor concentración en la superficie del material de estudio, pero las diferencias no eran estadísticamente significativas ($p= 0,28$).

Vp, en cambio, a este tiempo de estudio crecía más sobre la HA, pero los resultados no mostraban diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,17$).

An proliferaba mayormente en el disco de HA, comparado con el del material A, aunque los resultados no eran estadísticamente significativos ($p= 0,93$).

El material de estudio parecía afectar más que la HA al crecimiento de Fn, pero los resultados no mostraban diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,43$).

Se observaron diferencias en el desarrollo de So entre ambos discos, y en particular esta especie parecía proliferar menos en el disco del material A respecto a la HA, pero entre ambos materiales no había diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,89$).

Aa, en cambio, parecía madurar menos en HA que sobre el material A, pero las diferencias entre los resultados no era estadísticamente significativas ($p= 0,89$).

Comparación entre ambos discos de la evolución de cada especie a diferentes tiempos.

La especie Pg sobre el disco de HA parecía proliferar entre las 24 y las 48 horas. A las 72 horas los recuentos descendieron a un nivel aún más bajo que el inicial.

Vp parecía crecer mucho entre las 24 y las 48 horas, pero entre las 48 y las 72 horas los valores disminuyeron.

An parecía proliferar entre las 24 y las 48 horas. Sus recuentos parecían bajar entre 48 y 72 horas de maduración, y se mantenían más altos que los valores iniciales.

Fn presentaba unos valores iniciales mayores que a las 48 horas, que es el tiempo donde toca el pico más bajo. A las 72 horas se presenta en una cantidad muy parecida a la inicial.

Aa parece decrecer ligeramente entre las 24 y las 48 horas, pero presenta un fuerte descenso entre las 48 y las 72 horas.

Comparación entre ambos discos de la evolución de cada especie.

Entre las 24 y las 48 horas de evolución, comparando ambos discos, no se notaban diferencias estadísticamente significativas en la proliferación de So, pero entre las 48 y las 72 horas se apreciaba una menor proliferación de este microorganismo en el disco del Material A respecto a la Hidroxiapatita, y la diferencia era estadísticamente significativa. También se apreciaba una diferencia estadísticamente significativa comparando el crecimiento de Aa entre las 24 y las 72 horas.

Los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los demás microorganismos cultivados (So, An, Fn, Pg, Vp) al comparar los diferentes tiempos de maduración (24-48; 48-72; 24-72).

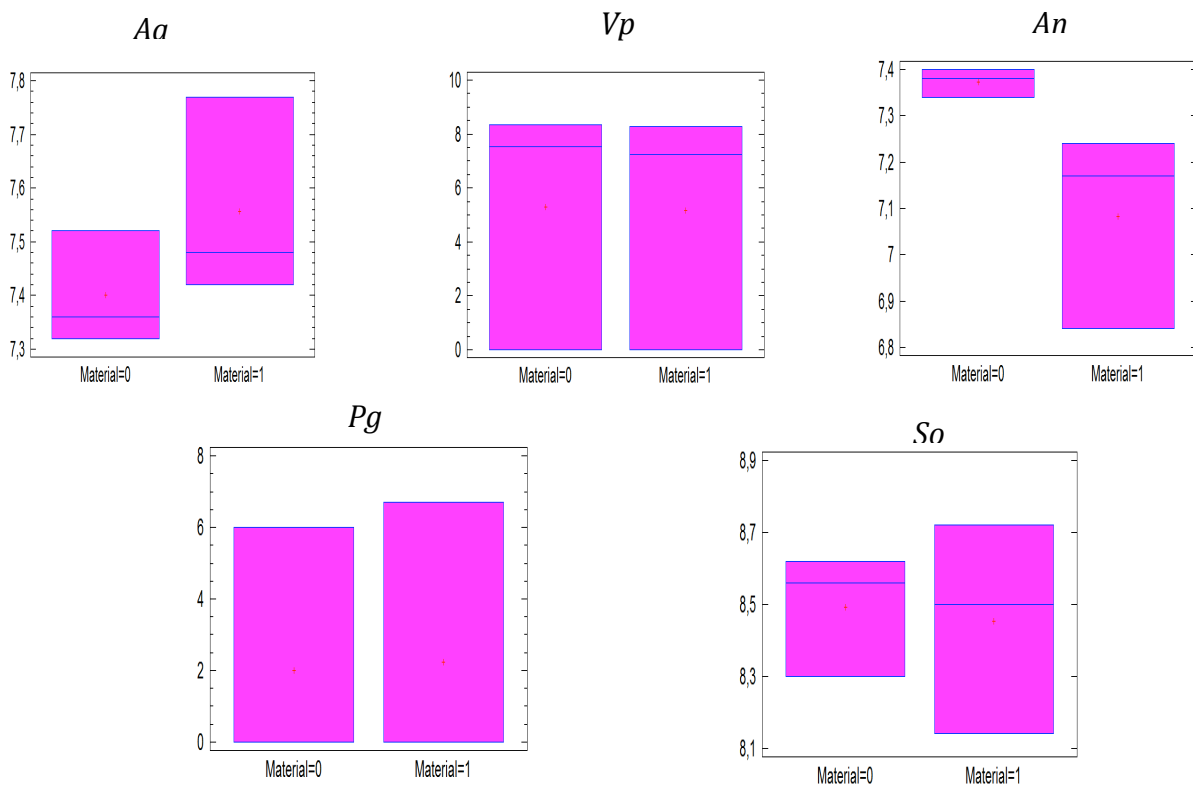


Figura 12. Representación gráfica en box-plot de la evolución de cada bacteria comparando el disco de Material A (izquierda) con el disco de Hidroxiapatita (derecha) a las 24 horas.

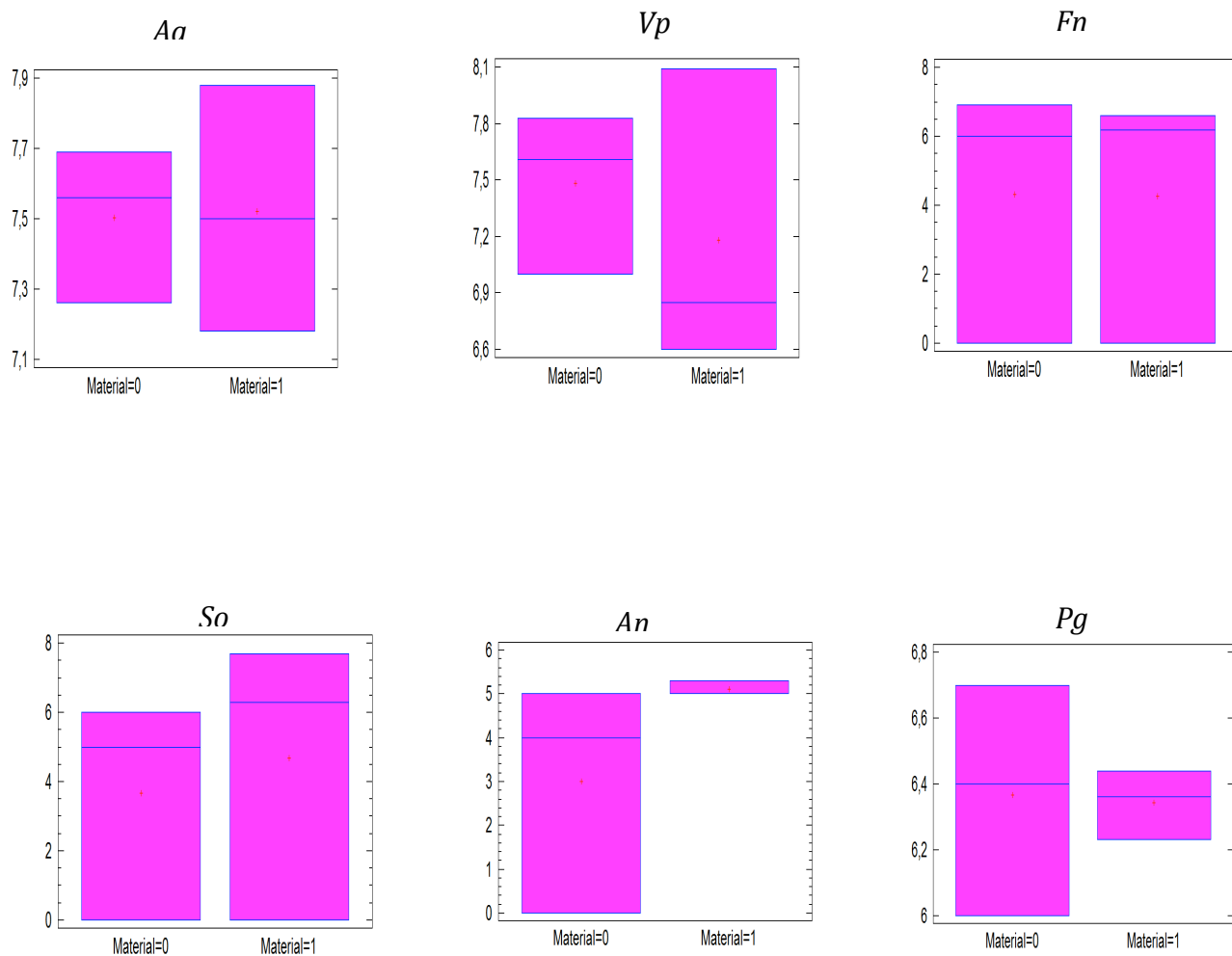


Figura 13. Representación gráfica en box-plot de la evolución de cada bacteria comparando el disco de Material A (izquierda) con el disco de Hidroxiapatita (derecha) a las 48 horas.

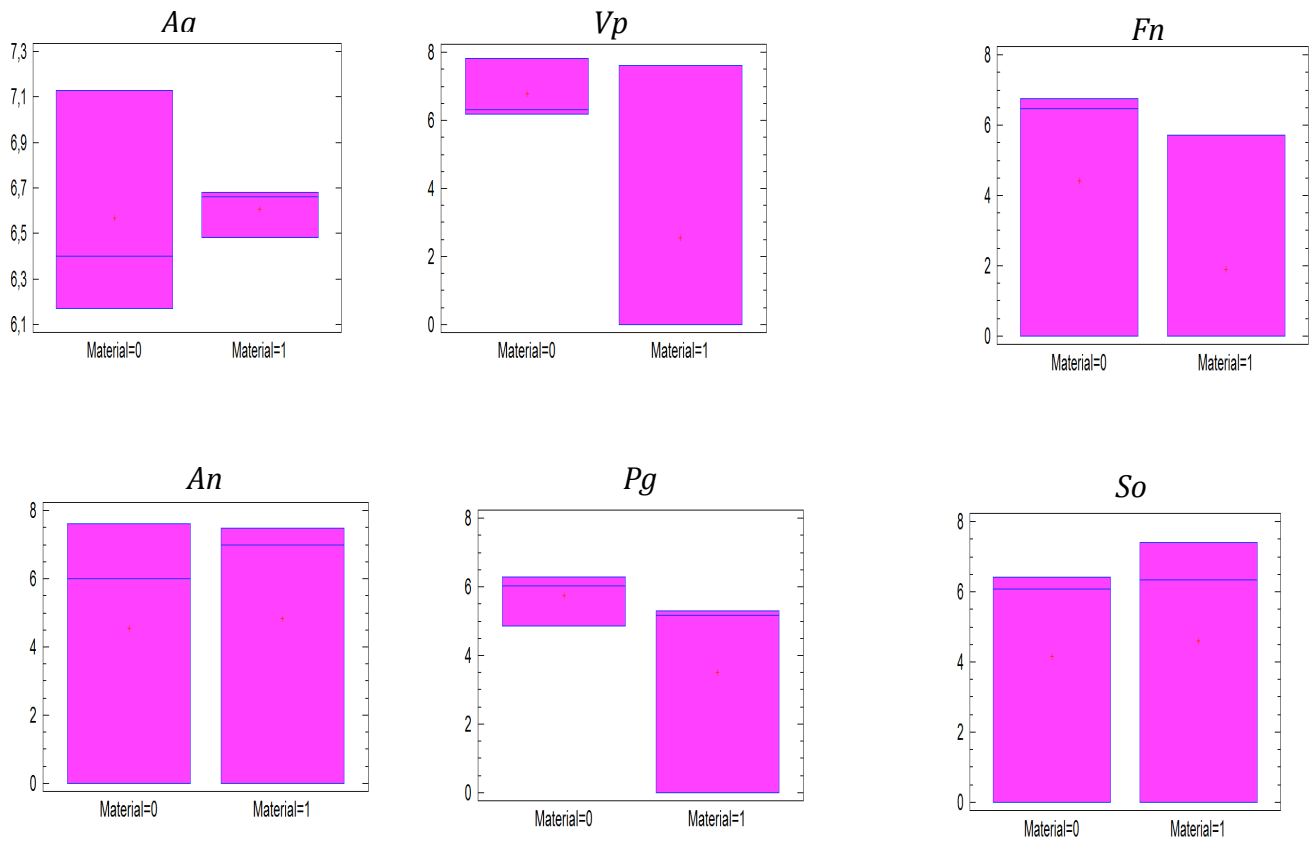


Figura 14. Representación gráfica en box-plot de la evolución de cada bacterias comparando el disco de Material A (izquierda) con el disco de Hidroxiapatita (derecha) a las 72 horas.

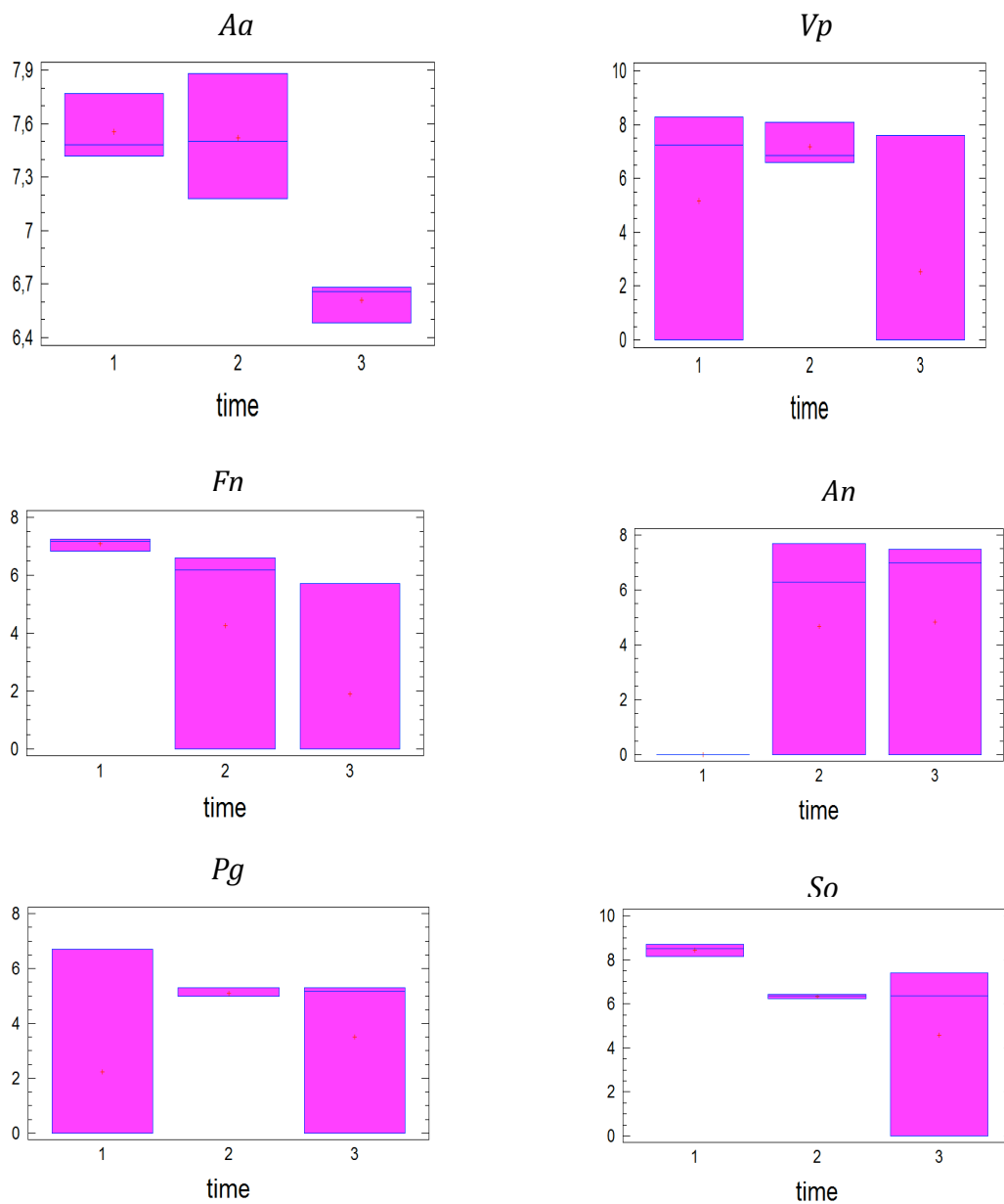


Figura 15. Representación gráfica en box-plot de la evolución de cada bacterias comparando el disco de Material A (izquierda) con el disco de Hidroxiapatita (derecha) a las 72 horas.

Tabla 3. Representación gráfica de los datos estadísticos (media y desviación estándar) relativos a cada bacteria, en cada tiempo y en cada ambas superficies.

BACTERIA	TIEMPO	MEDIA HA/ D.E HA*	MEDIA NC/ D.E M.A**	p***
<i>Aa</i>	24 horas	7,40 / D.E.= 7,42-7,52	7,55 / D.E.= 7,42-7,77	p= 0,27
<i>Vp</i>	24 horas	5,30 / D.E.= 0-8,36	5,17 / D.E.= 0-8,29	p= 0,97
<i>Fn</i>	24 horas	7,37 / D.E.= 7,34-7,40	7,08 / D.E.= 6,84-7,24	p= 0,08
<i>An</i>	24 horas	ND	ND	ND
<i>Pg</i>	24 horas	2,00 D.E.= 0-6,00	2,23 / D.E.= 0-6,7	p= 0,94
<i>So</i>	24 horas	8,49 D.E.= 8,30-8,62	8,45 D.E.= 8,14-8,72	p= 0,84
<i>Aa</i>	48 horas	7,50 / D.E.= 7,26-7,69	7,52 / D.E.= 7,18-7,88	p= 0,94
<i>Vp</i>	48 horas	7,48 / D.E.= 7,00-7,83	7,18 / D.E.= 6,60-8,09	p= 0,57
<i>Fn</i>	48 horas	4,30 / D.E.= 0,00-6,92	4,26 / 0,00-6,60	p= 0,98
<i>An</i>	48 horas	3,66 / D.E.=0,00-6,00	4,66 / D.E.= 0,0-7,70	p= 0,75
<i>Pg</i>	48 horas	3,0 / D.E.= 0,0-5,0	5,1 / D.E.=5,0-5,3	p= 0,24
<i>So</i>	48 horas	6,36 / D.E.= 6,0-6,7	6,34 / D.E.= 6,23-6,44	p= 0,91
<i>Aa</i>	72 horas	6,56 / D.E.= 6,17-7,13	6,60 / D.E.= 6,48-6,68	p= 0,89
<i>Vp</i>	72 horas	6,77 / D.E.= 6,18-7,82	2,53 / D.E.= 0,0-7,61	p= 0,17
<i>Fn</i>	72 horas	4,41 / D.E.= 0,0-6,75	1,90 / D.E.= 0,0-5,72	p= 0,43
<i>An</i>	72 horas	4,53 / D.E.= 0,0-7,61	4,82 / D.E.= 0,0-7,48	p= 0,93
<i>Pg</i>	72 horas	5,73 / D.E.=4,85-6,3	3,49 / D.E.= 0,0-5,3	p= 0,28
<i>So</i>	72 horas	4,16 / D.E.=0,0-6,43	4,58 / D.E.= 0,0-7,41	p= 0,89

• D.E. HA: Desviación Estándar respecto al valor medio en Hidroxiapatita.

** D.E. M.A: Desviación Estándar respecto al valor medio en Nanocomposite.

*** p: Significación estadística.

Tabla 4. ANOVA de la evolución bacteriana

A. Actynomicetemcomitans

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	0,036667	0,475549
1 - 3	*0,95	0,475549
2 - 3	*0,913333	0,475549

* indica una diferencia significativa. p= 0,0044

V. Parvula

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	-2,00667	7,32208
1 - 3	2,63667	7,32208
2 - 3	4,64333	7,32208

* indica una diferencia significativa p= 0,3615.

F. Nucleatum

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	2,82333	5,72188
1 - 3	5,17667	5,72188
2 - 3	2,35333	5,72188

* indica una diferencia significativa p=0,3615.

A. Naeslundii

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	-4,66667	6,76081
1 - 3	-4,82667	6,76081
2 - 3	-0,16	6,76081
* indica una diferencia significativa.		p= 0,5041

P. Gingivalis

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	-2,86667	5,66848
1 - 3	-1,26	5,66848
2 - 3	1,60667	5,66848
* indica una diferencia significativa.		p= 0,5041

S. Oralis

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	2,11	4,63639
1 - 3	3,86667	4,63639
2 - 3	1,75667	4,63639
* indica una diferencia significativa.		p= 0,2050

*** Indica una diferencia significativa.**

6. DISCUSIÓN

La rehabilitación del paciente parcialmente o totalmente edéntulo mediante el uso de implantes dentales es una práctica muy difusa hoy en día en la terapéutica dental. La superficie de los dispositivos implantares está en contacto íntimo con los tejidos duros y blandos de la cavidad oral del huésped y es sujeta a la colonización bacteriana. El mecanismo de formación y la composición del biofilm parecen ser muy similares sobre la superficie de los dientes y de los implantes. Se ha encontrado relación entre la maduración de una biopelícula, que en los tejidos blandos periodontales se asocia a gingivitis (Loe, 1965), y la aparición de mucositis en la mucosa peri-implantaria (Pontoriero et al. 1994), que con el paso del tiempo si no se trata puede evolucionar a peri-implantitis.

Se han comercializado distintos tipos de implantes, que se diferencian principalmente por características macro y micro-estructurales, y entre ellas destacan el tipo de superficie y sus propiedades físico-químicas (Taborelli, 1997). Se ha hipotetizado que las diferentes superficies implantares puedan tener influencia sobre la formación del biofilm, dificultando la adhesión bacteriana.

En el presente trabajo se ha analizado la influencia de la superficie del Material A en la formación del biofilm, comparada con un control de Hidroxiapatita, utilizando un modelo *in vitro* compuesto por seis bacterias representativas (Sánchez et al. 2011).

A las 24 horas, observando las imágenes obtenidas mediante CLSM (figura 7), se puede notar como sobre el disco de Hidroxiapatita haya mayor proliferación bacteriana respecto al disco de Material A, y que sobre la HA parece haber mayor cantidad de microorganismos viables. Analizando los resultados estadísticos, se observa que microorganismos colonizadores tardíos (Fn; Vp) y secundarios, como Aa, son más numerosos sobre la superficie del disco de Material A, comparado con la Hidroxiapatita.

También An es mayormente presente en el disco de Material A, y tanto colonizadores primarios (So) como especies periodontopatógenas (Pg) se presentan en mayor cantidad

sobre la superficie del material de estudio. Pg tiene valores menores (Tabla 3) respecto a las demás bacterias, de acuerdo a su curva de crecimiento.

En cambio Vp crece más sobre el disco de HA, y es la única especie que para esta superficie presenta valores mayores a las 24 horas. Estos resultados nos indican que a las 24 horas, a pesar de que haya menos bacterias viables sobre la superficie de Material A, la mayoría de los microorganismos que componen el biofilm utilizado se adhieren y proliferan más sobre el material de estudio, comparado con la Hidroxiapatita.

Resulta importante evidenciar que las diferencias entre los resultados no son estadísticamente significativas.

A las 48 horas, las imágenes del CLSM muestran una mayor acumulación bacteriana sobre la superficie de la HA (figura 8). La mayoría de las bacterias presentes parecen estar viables, pero se reconocen también microorganismos muertos. Sobre la superficie del Material A, en cambio, las bacterias parecen estar viables, pero en menor cantidad comparando con la HA.

Los resultados estadísticos (Tabla 3) indican que Aa ha proliferado de forma prácticamente igual sobre ambas superficies, aunque en cantidad ligeramente mayor sobre el disco de Material A.

Otras especies, como An y Pg, también proliferan más en la superficie del material de estudio, mientras que So, Vp y Fn se han desarrollado más sobre el disco de HA, aunque los resultados no son estadísticamente significativos.

Las diferencias muy pequeñas en el desarrollo de algunas de las especies (Aa, Fn y So) pueden significar que a las 48 horas de maduración la superficie de Material A no tiene efecto inhibitorio sobre uno o varios microorganismos individuales, pero puede tener influencia sobre el desarrollo general de la biopelícula, reduciendo el número total de bacterias presentes.

A las 72 horas ambas superficies están ampliamente colonizadas por los microorganismos, presentando mayor acumulación bacteriana respecto a los discos a las 24 y 48 horas, ya que

la evolución del biofilm procede, y se van incorporando un número mayor de células bacterianas.

En las imágenes del CLSM se nota como la superficie de Material A, arenada con corindón blanco, se caracteriza por la coloración roja, índice de pérdida de vitalidad de las bacterias que forman el biofilm, comparada con la HA, que en cambio presenta ambas coloraciones.

Las mayores diferencias entre ambas superficies en los valores medios de concentración bacteriana a este tiempo de estudio se pueden observar comparando Vp , Fn , y Pg , que muestran valores menores en el disco de Material A.

Las demás especies presentes no muestran grandes diferencias en términos de valores medios.

Se puede pensar, entonces, que el material de estudio tenga algún efecto sobre la proliferación tanto de especies colonizadoras primarias tardías (Fn y Vp), como de los colonizadores secundarios (Pg), y que éstas sean las especies que componen la mayor parte de las células que retienen la coloración roja, índice de pérdida de la viabilidad.

Es importante recordar que tampoco a este tiempo de estudio se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos materiales.

La evolución del biofilm sobre las dos superficies en el tiempo se analizó mediante test estadístico de ANOVA.

De esta forma fue posible realizar la comparación entre los dos materiales y al mismo tiempo también entre los tres tiempos de estudio.

El único dato que muestra diferencias estadísticamente significativas es la evolución de Aa (Tabla 4), en particular entre las 48 y 72 horas y entre las 24 y 72 horas ($p=0,004$).

Es interesante comparar la evolución de esta bacteria sobre las superficies estudiadas y su curva de crecimiento. Aa presenta la fase exponencial entre las 18 y las 30 horas de maduración (Sánchez et al., 2011), y es uno de los últimos microorganismos que se incorpora en el biofilm.

Parece que haya proliferado entre las 24 y las 48 horas, pero luego su concentración ha bajado de forma significativa respecto a las otras bacterias.

Las otras especies no muestran diferencias estadísticamente significativas en el tiempo comparando ambos materiales.

Esto indica que el Material A parece tener influencia sobre la viabilidad de los microorganismos que colonizan su superficie (figura 13) respecto al control de HA (figura 12), pero las diferencias entre ambos no es significativa desde el punto de vista estadístico. En la literatura hay otros estudios que describen los efectos del Oxido de Alúmina sobre especies bacterianas Gram -.

La presencia de Oxido de Alúmina (que representa el 99,7 % de la composición química del corindón blanco), puede tener influencia sobre la viabilidad bacteriana y en particular sobre las especies Gram negativas, que representan los microorganismos principales de la flora que coloniza la superficie implantaria en la región subgingival.

Uno de los principales componentes de la pared celular de estas bacteria es el Lipopolisacárido (LPS). Esta molécula puede también ser secretada por medio de vescículas y tiene la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria en el huésped (Kocgozlu et al., 2009).

Estudios in vitro han demostrado que las partículas de Oxido de Alúmina pueden alterar la estructura del LPS en la membrana, desnaturalizándola, o en las vescículas de las bacterias Gram -, inactivándolas (Jiang et al., 2013).

Las partículas de Oxido de Alúmina, además, parecen tener la capacidad de alterar la estructura de los fosfolípidos de la membrana celular bacteriana y provocar su lisis (Jiang et al., 2010)., que lleva el microorganismo a la muerte.

Es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos con el presente trabajo son preliminares.

No fue posible realizar un número mayor de experimentos o estudiar la evolución del biofilm sobre las dos superficies durante periodos más largos por falta de tiempo.

A pesar de estas limitaciones, la investigación en esta dirección parece ser prometedora.

Las patologías peri-implantarias son más agresivas respecto a las enfermedades periodontales y su tratamiento es más complejo (Lindhe et al. 1992, Zitzmann et al 2004).

En el futuro la investigación tiene que dirigirse a la elaboración de nuevas superficies que por sus propiedades físico-químicas sean capaces de inhibir la adhesión y/o la proliferación bacteriana.

Al día de hoy en la literatura científica todavía hay estudios poco concluyentes, y hay mucha diferencia en los resultados.

Hacen falta más estudios, que analicen el comportamiento del biofilm durante períodos de tiempo más largos.

Las enfermedades peri-implantarias son más agresivas que las enfermedades periodontales, así que su mejor tratamiento es la prevención.

7. CONCLUSIONES

Los discos de Material A cubiertos por corindón blanco no muestran diferencias estadísticamente significativas, comparados con el control de Hidroxiapatita, respecto a su capacidad para inhibir o reducir la adhesión y la proliferación de las 6 especies bacterianas (*S. Oralis*, *V. Parvula*, *A. Naeslundii*, *F. Nucleatum*, *A. Actinomcetemcomitans*, *P. Gingivalis*) seleccionadas según el modelo de biofilm estático propuesto por Sánchez et al. (2011).

La viabilidad de los microorganismos parece mantenerse en el tiempo.

Las comparaciones estadística a cada tiempo por cada una de las especies seleccionadas no ponen en evidencia diferencias estadísticamente significativas por ninguno de los microorganismos.

Aa es la única especie que se caracteriza por una reducción significativa en la concentración en el tiempo, comparando los resultados obtenidos a las 48 y 72 horas y a las 24 y 72 horas, pero no entre las 24 y 48 horas.

El disco de Material A recubierto por corindón blanco parece afectar más a la viabilidad de esta especie respecto a la Hidroxiapatita.

Los recuentos bacterianos ponen en evidencia que el material de estudio no tiene una influencia significativa sobre las especies que componen el modelo de biofilm utilizado respecto al control de Hidroxiapatita.

El biofilm parece formarse en ambos discos de forma similar, y las bacterias seleccionadas parecen ser capaces de colonizar tanto la superficie del disco de Material A arenado con corindón blanco, como la del disco de Hidroxiapatita.

8. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, gracias a mi tutor, Bettina Alonso, por darme esta oportunidad.

Especial agradecimiento a todo el personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología: Arancha Llama- Palacios, María del Carmen Sánchez, María José Marín, Elena Figuero, Itziar González, y Ana O'Connor, ya que sin su ayuda y dedicación no me habría sido posible realizar este trabajo.

Gracias a mis compañeros de trabajo Honorato Vidal Ribeiro y Roquelina Pianeta Alviz, que han estado trabajando conmigo todo este año y me han ayudado siempre que lo he necesitado.

Por último, quiero agradecer la ayuda y asistencia técnica de Alfonso Cortés del Centro de Microscopía y Citometría de la Universidad Complutense de Madrid.

Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad proyecto nº MATBIO2012-38645, estando este proyecto cofinanciado por el FEDER

8. BIBLIOGRAFIA

- Alberktsson, T. & Isidor, M., 1994. Consensus report: Implant therapy.
- P. O. T. 1. E. W. O. Periodontology, ed. *Quintessence*, pp.365–369.
- Albouy, J.-P. et al., 2008. Spontaneous progression of peri-implantitis at different types of implants. An experimental study in dogs. I: clinical and radiographic observations. *Clinical Oral Implants Research*, 19(10), pp.997–1002.
- Bauer, S. et al., 2013. Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces. *Progress in Materials Science*, 58(3), pp.261–326.
- Berglundh, T., 2002. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *Journal Of Clinical Periodontology*, pp.1–16.
- Berglundh, T. & Lindhe, J., 1992. Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. *Clinical Oral Implant Research*, (3), pp.1–8.
- Costerton, J.W., 2001. Antibiotic Resistance of bacteria in biofilm. *ProQuest*, pp.1–12.
- Costerton, J.W., 1999. Introduction to biofilm. *American Journal Of Antimicrobial Agents*, pp.1–5.
- Jiang, W. & Yang, K., 2010. Interaction between oxide nanoparticles and biomolecules of the bacterial cell envelope as examined by infrared spectroscopy. *Langmuir*, (23), pp.7–26.
- Jiang, W. et al., 2013. Effect of Al₂O₃ nanoparticles on bacterial membrane amphiphilic biomolecules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, pp.292–299.
- Junker, R. et al., 2009. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research*, 20, pp.185–206.
- Kocgozlu, L. & Elkaim, R., 2009. Variable Cell Responses to P. Gingivalis Lipopolysaccharide. *Journal of Dental Research*, 88(8), pp.741–745.
- Kolebrander, P.E. & Andersen, R.N., 2002. Communication among oral bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, (66), pp.486–505.
- Lang, N.P., Berglundh, T. on Behalf of Working Group 4 of the Seventh European Workshop on Periodontology, 2011. Periimplant diseases: where are we now? - Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal Of Clinical Periodontology*, 38, pp.178–181.
- Le Guéhennec, L. et al., 2007. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials*, 23(7), pp.844–854.
- Lindhe, J., 1975. The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal

- therapy in cases of advanced disease. *journal Of Clinical Periodontology*, pp.1–14.
- Lindhe, J. & Berglundh, T., 1992. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. *Clinical Of Oral Implant Research*, (3), pp.9–16.
- Lindhe, J., Meyle, J. on behalf of Group D of the European Workshop on Periodontology, 2008. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *journal Of Clinical Periodontology*, 35, pp.282–285.
- Listgarten, M.A., 1976. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study
. *Journal of Periodontology*, (47), pp.1–18.
- Loe, H., 1965. Experimental gingivitis in man. *journal Of Clinical Periodontology*, (36), pp.177–187.
- Marsh, P.D., 2005. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *journal Of Clinical Periodontology*, pp.1–9.
- Mombelli, A. & Décaillot, F., 2011. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *journal Of Clinical Periodontology*, 38, pp.203–213.
- Persson, L.G., 2001. Re-osseointegration after treatment of peri-implantitis at different implantsurfaces. *Clinical Oral Implant Research*, pp.1–9.
- Persson, L.G., 1999. Resolution Of Peri-implantitis following treatment. *Clinical Oral Implant Research*, pp.1–9.
- Pontoriero, R., Tonelli, M. & Carnevale, G., 1994. Experimentally induced peri-implant mucositis. *Clinical Oral Implant Research*, (5), pp.254–259.
- Renvert, S., 2011. How do implant surface characteristics influence peri-implant disease? *journal Of Clinical Periodontology*, pp.1–9.
- Sánchez, M.C. et al., 2011. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *Journal of Periodontal Research*, 46(2), pp.252–260.
- Socransky, S. & Haffajee, A., 2001. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*, (28), pp.12–55.
- Socransky, S. & Haffajee, A., 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *journal Of Clinical Periodontology*, (25), pp.133–144.
- Taborelli, M. & Tonetti, M., 1997. Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. *Clinical Oral Implant Research*, pp.1–9.
- Theilade, E. & Theilade, J., 1985. Formation and ecology of plaque at different locations in the mouth
. *Scandinavian Journal Of Dental Research*, (93), pp.90–95.

- Wanneberg, A. & Albrektsson, T., 2010. On Implant Surfaces: A Review of Current Knowledge and Opinion. *International journal Of Oral and Maxilofacial Implants*, (24), pp.63–74.
- Zitzmann, N.U. & Berglundh, T., 2008. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *journal Of Clinical Periodontology*, 35, pp.286–291.